

546,829

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 9 月 10 日 (10.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/076483 A1(51) 国際特許分類:
C12N 15/12, A61K 38/00, A61P 35/00

C07K 14/47,

中央区築地5-1-1 国立がんセンター研究所 放射線研究
部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002238

(74) 代理人: 下田 昭 (SHIMODA, Akira); 〒1040031 東京
都中央区京橋3-3-4京橋日英ビル4階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 2 月 25 日 (25.02.2004)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-048658 2003 年 2 月 26 日 (26.02.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行
政法人 科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉
県川口市本町4-1-8 Saitama (JP). 国立がんセンター
総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED
BY PRESIDENT OF NATIONAL CANCER CENTER)
[JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地5-1-1 Tokyo (JP).(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田矢 洋一 (TAYA,
Yoichi) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地5-1-1 国
立がんセンター研究所 放射線研究部内 Tokyo (JP). 江
成 政人 (ENARI, Masato) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRANSCRIPTIONAL FACTOR INDUCING APOPTOSIS IN CANCER CELL

(54) 発明の名称: 癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

(57) Abstract: It is intended to provide a novel means of treating cancer whereby cancer cells are destroyed by inducing apoptosis exclusively therein. Namely, a transcriptional factor for inducing apoptosis in cancer cells which comprises p53 or a p53 mutant having deletion, substitution or addition of one to several amino acids in p53 and clathrin heavy chain. This transcriptional factor enhances the transcription ability of p53AIP1 promoter and thus induces apoptosis in cancer cells.

(57) 要約: 癌細胞にのみアポトーシスを誘導して死滅させる新しい癌治療の手段を提供する。p53又は1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異p53、及びクラスリン重鎖から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子である。この転写因子は、p53AIP1プロモーターの転写能を高め、癌細胞のアポトーシスを誘導する。

WO 2004/076483 A1

明 細 書

癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

5 技術分野

この発明は、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子に関する。

従来技術

癌抑制遺伝子 p 5 3 は p 2 1、p 5 3 R 2 又は p 5 3 A I P 1 等の標的遺伝子の DNA 配列に特異的に結合して、その転写活性を制御する転写因子であり、近年 p 5 3 の関与する細胞癌化のメカニズムは詳しく研究されてきている（細胞工学 vol. 22, No.1, 23-28 (2003)）。p 5 3 が制御する標的遺伝子の中で、p 5 3 A I P 1 はミトコンドリアに局在するタンパク質で、ミトコンドリアの膜電位とシトクロム c の放出を制御することで正のアポトーシス作用を有している（Oda K. et al., Cell, Vol.102, 849-862, 2000 ; Matsuda K. et al., Cancer Res., Vol. 62, 2883-2889, 2002）。この p 5 3 A I P 1 は p 5 3 によるアポトーシス誘導に重要な役割を持つ S e r 4 6 のリン酸化（特願 2 0 0 1 - 2 9 2 9 5 3）に強い相関を示し、p 5 3 A I P 1 遺伝子の発現により癌細胞のアポトーシスが誘導される。例えば、DNA が損傷される等の強いストレスを受けると、転写因子 p 5 3 の S e r 4 6 が p 5 3 D I N P 1 等の働きによりリン酸化を受け、p 5 3 A I P 1 の発現が誘発され、癌細胞のアポトーシスが誘導され则认为られている（細胞工学 vol. 22, No.1, 23-28 (2003)）。

一方、癌細胞のアポトーシスを誘導することを目的として、シスプラチンなどの抗癌剤が使用されているが、ほとんどが DNA に傷をつけることによってアポトーシスを誘導するものである。そのため、正常細胞の DNA にも傷がついて副作用が現れる。癌の放射線療法も同様に正常細胞の DNA に傷がついて副作用が現れる。

この他にも、p 5 3 の遺伝子や、p 5 3 によって誘導されてアポトーシスを誘導する B a x や p 5 3 A I P 1 などの遺伝子をアデノウィルスベクターに組み込

んで癌細胞に感染させ、アポトーシスを誘導させて死滅させようという試みもなされてはいるが、よい結果が得られているとはいえない。

発明が解決しようとする課題

- 5 この発明は、癌細胞にのみアポトーシスを誘導して死滅させる新しい癌治療の手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、癌細胞から p 5
10 3 の発現に伴ってクラスリン重鎖と見られる約 170 kDa のタンパク質が共沈殿してくることを見出し、クラスリン重鎖の cDNA を発現ベクターに導入して癌細胞の核内へトランスフェクトすると、p 53 AIP1 プロモーターの転写能を高めることを見出した。このような結果から、このクラスリン重鎖と p 53 とが結合して転写因子を構成し、p 53 AIP1 プロモーターの転写能を高め、癌
15 細胞のアポトーシスを誘導すると結論された。

- 即ち、本発明は、p 53（配列番号 1）又はその 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異 p 53、及びクラスリン重鎖（配列番号 2）から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子である。これらは、ヒト等の組織や細胞から抽出・精製して取り出して用いてもよいし、これらをコードす
20 る DNA を含む形質転換体を培養して得て用いてもよい。

また、前記変異 p 53 は、少なくとも 46 位の S e r が置換された p 53 であってもよく、特にその 46 位の S e r が P h e に置換されていることが好ましい。

また本発明は、この転写因子を有効成分とする癌の治療薬である。

25 図面の簡単な説明

第 1 図は、クラスリン重鎖による p 53 AIP1 の転写活性の制御の概念図を示す。

第 2 図は、p c - p 53 - f ベクターの構造を示す。

第 3 図は、p 53 AIP1. p r o . r e p o r t e r ベクターの構造を示す。

第4図は、p c-CHCベクターの構造を示す。

第5図は、発現ベクター (pcDNA-p53-f) をヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その p 5 3 A 1 P 1 プロモーターからの転写能を示す。

第6図は、発現ベクター (pcDNA3.1、pcDNA-p53-f) をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞抽出物の SDS-PAGE (銀染色) を示す。

第7図は、発現ベクター (pcDNA-p53-f) をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞抽出物の抗クラスリン重鎖抗体及び抗 p 5 3 抗体によるウエスタンブロットを示す。図中、WT は WT-p53、46A は S46A-p53、46D は S46D-p53、46F は S46F-p53、Δ 44-63 は 44-63-p53 を用いたものを示す。

第8図は、発現ベクター (pcDNA3.1、pcDNA-p53-f) をヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトした細胞の細胞質及び核抽出物に対し、抗クラスリン重鎖抗体を用いたウエスタンブロットを示す。図中、pcDNA は pcDNA3.1、WT は WT-p53、46F は S46F-p53、Δ 44-63 は 44-63-p53 を用いたものを示す。

第9図は、クラスリン重鎖の cDNA を入れた発現ベクター (pc-CHC) と p 5 3 発現ベクター (pcDNA-p53-f) を共にヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた結果を示す。図中、Clathrin HC は pc-CHC、WT は WT-p53、S46F は S46F-p53、Δ 44-63 は 44-63-p53 を用いたものを示す。

20 発明の実施の形態

クラスリンには重鎖と軽鎖とがあり、普通は細胞表面から内部への物質の取り込みであるエンドサイトーシスに働く。しかし、本研究の結果、発明者らは、このクラスリン重鎖が、第1図に示すように、癌細胞の中で軽鎖とは結合せずに p 5 3 と結合して p 5 3 の転写活性化能を高め、アポトーシスを強く誘導することを見出した。特に、p 5 3 のセリン46をフェニルアラニンに置換した p 5 3 とは特に強く結合してアポトーシスも強く誘導する。

本発明の転写因子を何らかの方法で癌細胞に注入するか、又はクラスリン重鎖のみを何らかの方法で癌細胞に注入し癌細胞中に存在する p 5 3 と結合させることにより、癌細胞にアポトーシスを誘導して死滅させることができる。

このような転写因子を利用すれば、正常細胞には傷をつけないで、癌細胞にのみ特異的に、従来の方法よりも効果的にアポトーシスを誘導させて死滅させることが可能になり、従来の方法よりも効率のよい癌治療法になる。

- 5 以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。

試験例 1

この試験例では、以後の試験で用いる下記 5 種のベクター（これらを総称して
10 「pcDNA-p53-f」という。）を作成した。

(i) 野生型ヒト p 5 3 遺伝子を p c DNA 3 プラスミド (Invitrogen 社、第 2 図参照) に挿入した野生型ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「WT-p53」という。）

(ii) 4 6 位の S e r を A l a に置き換えた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c D
15 NA 3 プラスミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「S46A-p53」という。）

(iii) 4 6 位の S e r を A s p に置き換えた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c
DNA 3 プラスミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「S46D-p53」という。）

20 (iv) 4 6 位の S e r を P h e に置き換えた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c D
NA 3 プラスミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「S46F-p53」という。）

(v) 4 4 ~ 6 3 位を欠失させた変異型ヒト p 5 3 遺伝子を p c DNA 3 プラス
ミドに挿入した変異ヒト p 5 3 発現ベクター（以下「44-63-p53」という。）

25 以上のベクターを以下の手順で作成した。

各種 pcDNA-p53-f は、まず pcDNA3 プラスミド (Invitrogen 社) を制限酵素 XhoI 部位及び XbaI 部位で切断し、9 アミノ酸残基からなる Flag 配列 (GDYKDDDDK) をコードする二本鎖 DNA (配列番号 8) を挿入した (pcDNA-f)。作製した pcDNA3-f プラスミドの制限酵素 BamHI 部位及び XhoI 部位を切断し、

BamHI 部位及び XhoI 部位切断末端を持つ野生型ヒト p53 遺伝子 (配列番号 9) 又は変異型ヒト p53 遺伝子を挿入した (pcDNA-p53-f)。これらベクターの地図を第 2 図に示す。

5 試験例 2

この試験例では、p53AIP1 遺伝子イントロン 1 内にある p53 結合配列を含む約 500bp を pGL3-promoter ベクター (Promega 社) の luciferase 遺伝子の上流へ挿入したレポータープラスミドを作成した。

pGL3-promoter ベクター (Promega 社) を制限酵素 SacI 部位及び BglII 部位で切断し、制限酵素 SacI 部位及び BglII 部位切断末端を持つ p53 結合配列を含む p53AIP1 イントロン 1 (約 500bp、配列番号 10) を挿入した。このベクターの地図を第 3 図に示す。以下このレポーターを「p53AIP1pro.reporter」という。

15 試験例 3

試験例 1 と同様の操作で、クラスリン重鎖遺伝子 (かずさ DNA 研究所から分与、配列番号 11) を pcDNA3 プラスミド (Invitrogen 社、第 2 図参照) に挿入して、クラスリン重鎖発現ベクター (以下「pc-CHC」という。) を作成した。このベクターの地図を第 4 図に示す。

20

試験例 4

この試験例では、試験例 1 で用意した 5 種の発現ベクターをヒト骨肉腫由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた。

試験は以下の手順で行った。

- 25 1) 7×10^4 個の Saos-2 細胞 (骨肉腫由来) を 24 穴プレートに蒔き、一晚培養した。
- 2) トランスフェクションするための DNA を、試験例 1 と試験例 2 で用意した pcDNA-p53-f と p53AIP1pro.reporter を用いて、表 1 のように調製した。加えた各 pcDNA-p53-f は 0 ~ 30 ng 用い、pcDNA3.1 と併せて総量 30 ng とした。

なお、phRG-TKは、ウミシイタケluciferaseを発現するプラスミド（Promega社、内部コントロール）を示す。トランスフェクションの方法はInvitrogen社のキットに添付されているプロトコールに従った。

表 1

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	30 ng
p53AIP1pro.reporter	100 ng
phRG-TK	10 ng
Total	140 ng
OPTI-MEM	25 μ l

OPTI-MEM	25 μ l
Lipofectamine 2000	0.28 μ l

Lipo溶液

DNA溶液

- 3) DNA溶液とLipo溶液を混和し、室温で30分間インキュベーションした。
- 4) そのDNA-liposome複合体を1) で調製した細胞に滴下した。
- 5) 4時間後、DNA-liposome複合体を除去し、細胞を1 X PBS-で洗浄した。
- 6) トランスフェクションしてから24時間後、細胞を1 X PBS-で洗浄し、Dual luciferase assay kit（Promega社）を用いて、細胞中のホタルluciferase活性及びウミシイタケluciferase活性（内部コントロール）をそれぞれルミノメーターで測定した。その測定方法は、Promega社のキットに添付されているプロトコールに従って行った。
- 7) pcDNA3.1を導入した細胞抽出液中のホタルluciferase活性をウミシイタケluciferase活性で割った値を1とした時の相対的な活性（Fold Activation）を算出した。

その結果を第5図に示す。p53のSer46Phe置換体はp53AIP1プロモーターからの転写を野生型よりもかなり強く誘導することがわかった。

20 実施例1

この実施例では、試験例1で用意した5種の発現ベクターをヒト非小肺がん由来細胞にトランスフェクトし、その細胞抽出物を調べた。

試験は以下の手順で行った。

- 1) 9×10^6 の H1299 細胞（非小肺がん由来）を 15 cm ディッシュに蒔き、一晩培養した（10 枚）。

2) トランスフェクションするための DNA を表 2 のように調製した。トランスフェクションの方法は Roche Applied Science のキットに添付されているプロトコールに従った。

表 2

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	8 μ g	ディッシュ1枚当たり
FuGENE 6	48 μ l	
D-MEM	752 μ l	

DNA-liposome溶液

5

3) その DNA-liposome を室温で 30 分間インキュベーションし、1) で調製した細胞に滴下した。

4) トランスフェクションしてから 21 時間後、細胞をスクレイパーで剥がし、600 x g、5 分間低速遠心して細胞を回収した。

10 5) 細胞を 1 度 X PBS-で洗浄した後、10 ml の表 3 の下記細胞溶解緩衝液で細胞を溶解した。

表 3

細胞溶解緩衝液*

50 mM Tris-HCl (pH7.2)	10 μ g/ml antipain
150 mM NaCl	10 μ g/ml pepstatin
2 mM MgCl ₂	10 μ g/ml chymostatin
0.1 mM EDTA	10 μ g/ml leupeptin
0.1 mM EGTA	10 μ g/ml E64
0.5 mM DTT	10 μ g/ml PMSF
1 mM Na ₃ VO ₄	0.1 % NP-40
10 mM NaF	

6) 細胞を超音波破碎後、不溶性画分を 15krpm、15 分間、4°C で除去した。

15 7) その上清を 0.2 ml の抗 FLAG 抗体アガロースビーズ (Sigma) と一晚インキュベーションした。

8) インキュベーション後、ビーズを上記細胞溶解緩衝液で 4 回洗浄した。

9) その後、1.5 mg/ml FLAG ペプチドを含む上記細胞溶解緩衝液で競合的にビーズから p53 タンパク質溶出した。

10) その溶出画分を SDS-PAGE 次いで銀染色した。

その結果を第6図に示す。その結果、S46F置換体ではp53と一緒に分子量170 kDaのタンパク質が強く共沈殿してくる。これをマスマススペクトロメトリにかけてみたところ、LHIIEVGTPPTGNQPFPPK、IVLDN
5 SVFSEHR、VANVELYYR、QLPLVKPYLR、及びVDKLD
ASESLR (配列番号3~7) のアミノ酸配列が得られた。これらは、それぞれクラスリン重鎖 (配列番号2) の228-245、1011-1022、13
10 98-1406、1444-1453、及び1610-1620位に相当する。
これは、この170 kDaのタンパク質がクラスリンの重鎖であることを示す。

11) 170 kD のタンパク質の同定には銀染色で使われた量の約20倍のタンパク質を濃縮し、SDS-PAGE 次いでCBB 染色、目的バンドの切り出し、トリプシン消化後、質量分析を用いて行った。

12) 10) の実験手順で得られた溶出液の100分の1容を SDS-PAGE 次いで PVDF 膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体 (Transduction Laboratories)
あるいは抗p53抗体 (Santa Cruz) を用いたウエスタンブロッティング法を行った。ここでは Amersham 社の horseradish peroxidase-抗マウス IgG 二次抗体と ECL キットを用いてバンドを視覚化した。

20 その結果を第7図に示す。S46F置換体にクラスリン重鎖が特に強く結合することがわかった。

試験例5

この試験例では、実施例1で用いたヒト非小肺がん由来細胞の核抽出物を調べた。試験は以下の手順で行った。

1) 15 cm ディッシュ一枚分を実施例1と同様の手順でトランスフェクションした。

2) 細胞を回収後、1 ml の表4の低張緩衝液*1で細胞を懸濁し、ホモジナイザーで細胞膜を破壊した。

表 4

低張緩衝液*1

10 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 µg/ml antipain
10 mM KCl	10 µg/ml pepstatin
1.5 mM MgCl ₂	10 µg/ml chymostatin
0.5 mM DTT	10 µg/ml leupeptin
1 mM Na ₃ VO ₄	10 µg/ml E64
50 mM NaF	10 µg/ml PMSF

高張緩衝液*2

25 mM HEPES-KOH (pH7.9)	10 µg/ml antipain
420 mM KCl	10 µg/ml pepstatin
10 % glycerol	10 µg/ml chymostatin
0.1 mM DTT	10 µg/ml leupeptin
1 mM Na ₃ VO ₄	10 µg/ml E64
50 mM NaF	10 µg/ml PMSF

3) それを 600 x g、5 分間、4℃で低速遠心し、細胞質画分と核画分に分離した。

5 4) 核画分に関しては2)、3)の操作を2回繰り返し、核画分に細胞質由来のタンパク質の持ち込みをできる限り除去した。

5) 核画分を 0.2 ml の表4の高張緩衝液*2で懸濁し30分間氷上に置き、核からタンパク質を溶出した。

6) 10 k x g、5分間、4℃で核画分から不溶性画分を除去した。

10 7)細胞質画分と核画分由来のタンパク質をSDS-PAGE次いでPVDF膜に転写後、抗クラスリン重鎖抗体を用いた実施例1と同様にウエスタンブロッティング法を行った。核画分は細胞質に比べ5倍量の細胞由来のタンパク質を用いた。

その結果を第8図に示す。この結果、クラスリンは細胞質でのみ働くと思われていたが、クラスリン重鎖の一部は核内にも存在することを確認した。

実施例 2

この実施例では、試験例4の手順のうち2)のトランスフェクションするためのDNAを、試験例3で用意したpc-CHCを用いて、表5のように調製した以外は、試験例4と同様の試験を行った。

表 5

pcDNA3.1あるいはpcDNA-p53-f	30 ng	OPTI-MEM	25 μ l
p53AIP1pro.reporter	100 ng	Lipofectamine 2000	0.28 μ l
pcDNA3.1あるいはpc-CHC	400 ng		
phRG-TK	10 ng		
Total		Lipo溶液	
OPTI-MEM			
25 μ l			

DNA溶液

5

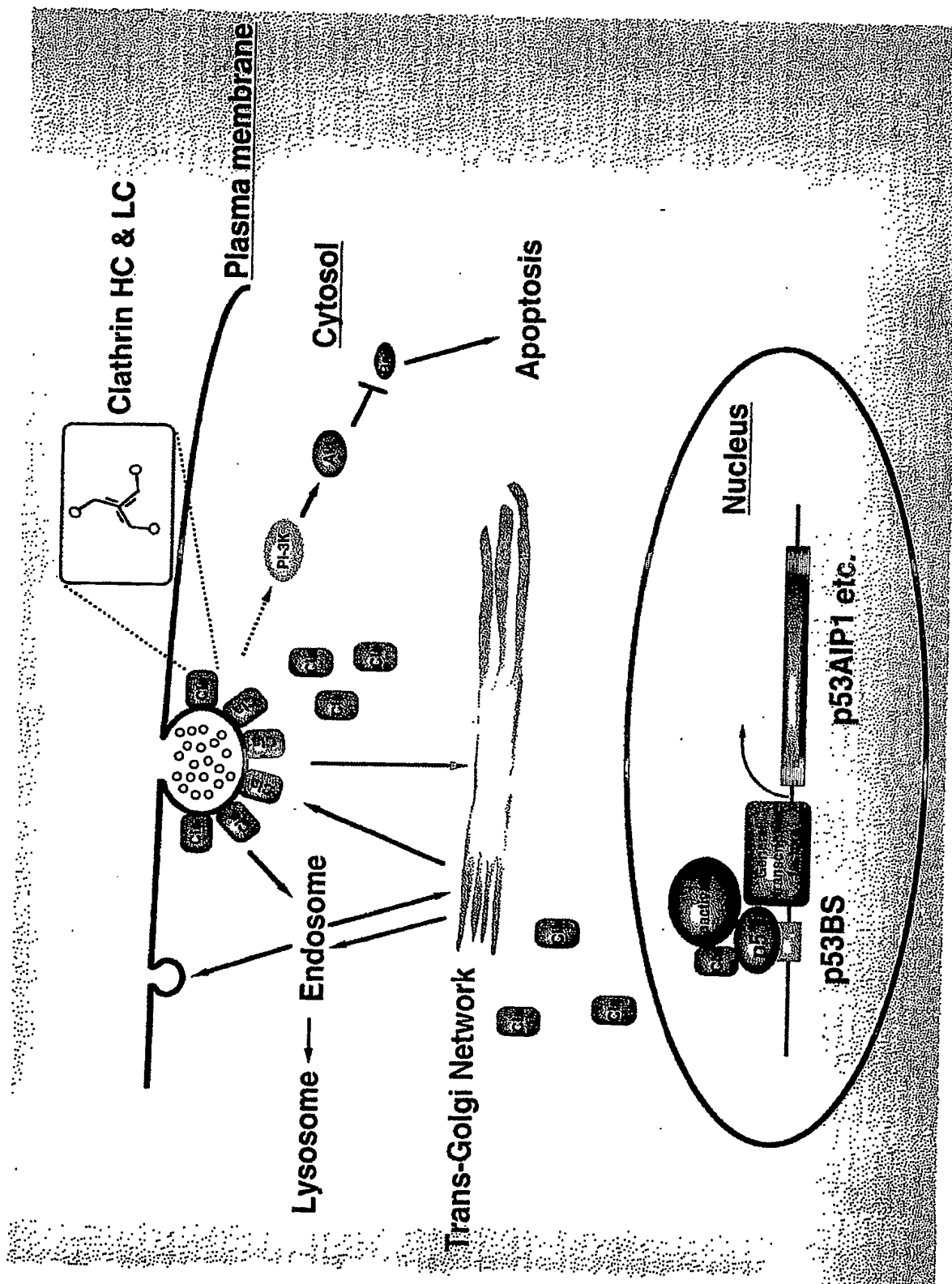
その結果を第9図に示す。上記DNA溶液において、pc-CHC(400ng)を用いたものをClathrin +、pcDNA3.1(400ng)を用いたものをClathrin -と表記する。

10 クラスリン重鎖のcDNAを発現ベクターに入れてp53と共にトランスフェクトすると、p53A1P1プロモーターからの転写能を高めたことが認められた。特に、S46F置換体では強く高められた。

請求の範囲

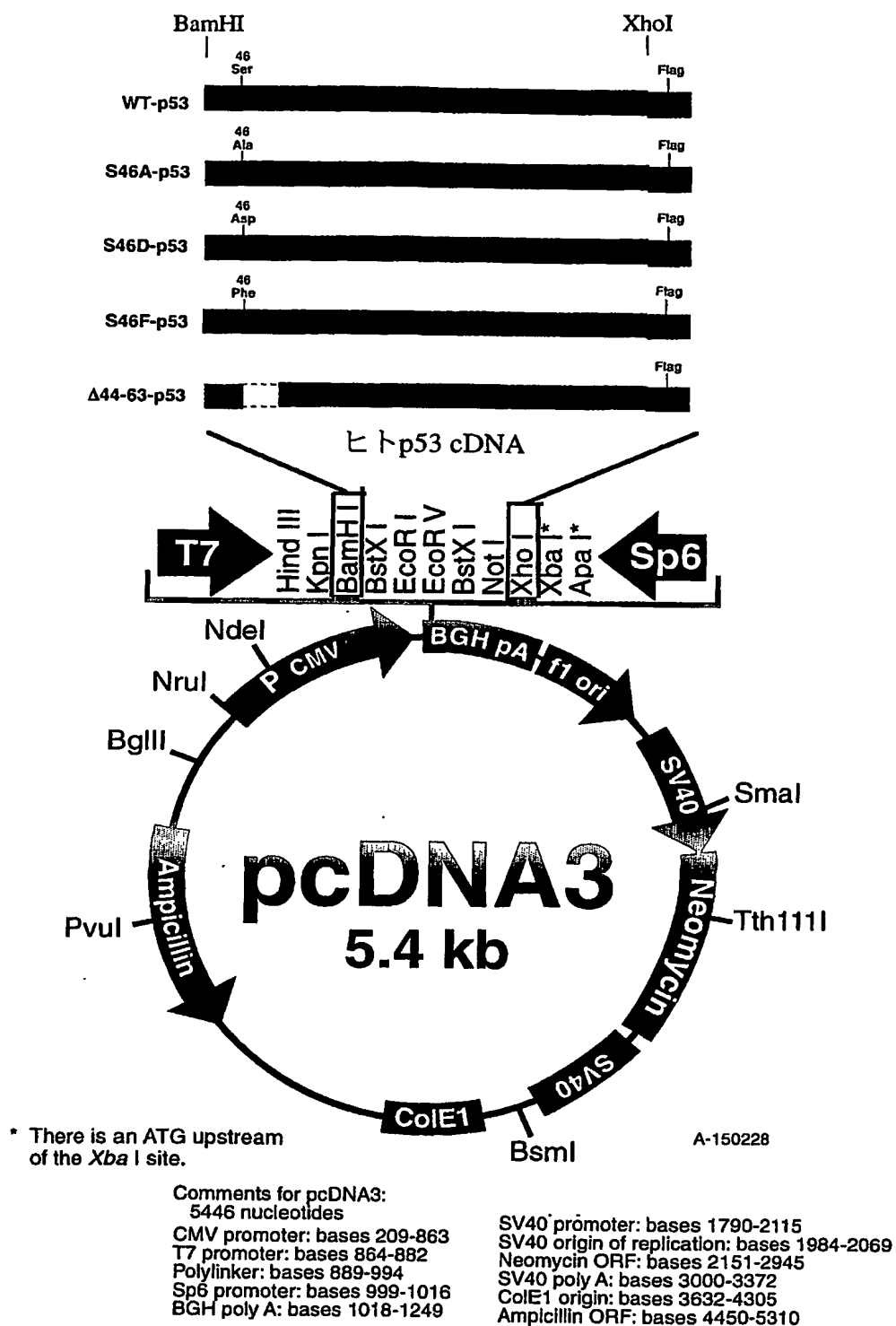
1. p 5 3又はその1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された変異p 5 3、及びクラスリン重鎖から成る、癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子。
5
2. 前記変異p 5 3が、少なくとも46位のS e rが置換されたp 5 3である請求項1又に記載の転写因子。
3. 前記変異p 5 3が、その46位のS e rがP h eに置換されている請求項2に記載の転写因子。
- 10 4. 請求項1～3のいずれか一項に記載の転写因子を有効成分とする癌の治療薬。
5. 請求項1～3のいずれか一項に記載の転写因子又はクラスリン重鎖を癌細胞に注入することから成る癌治療法。

第 1 図



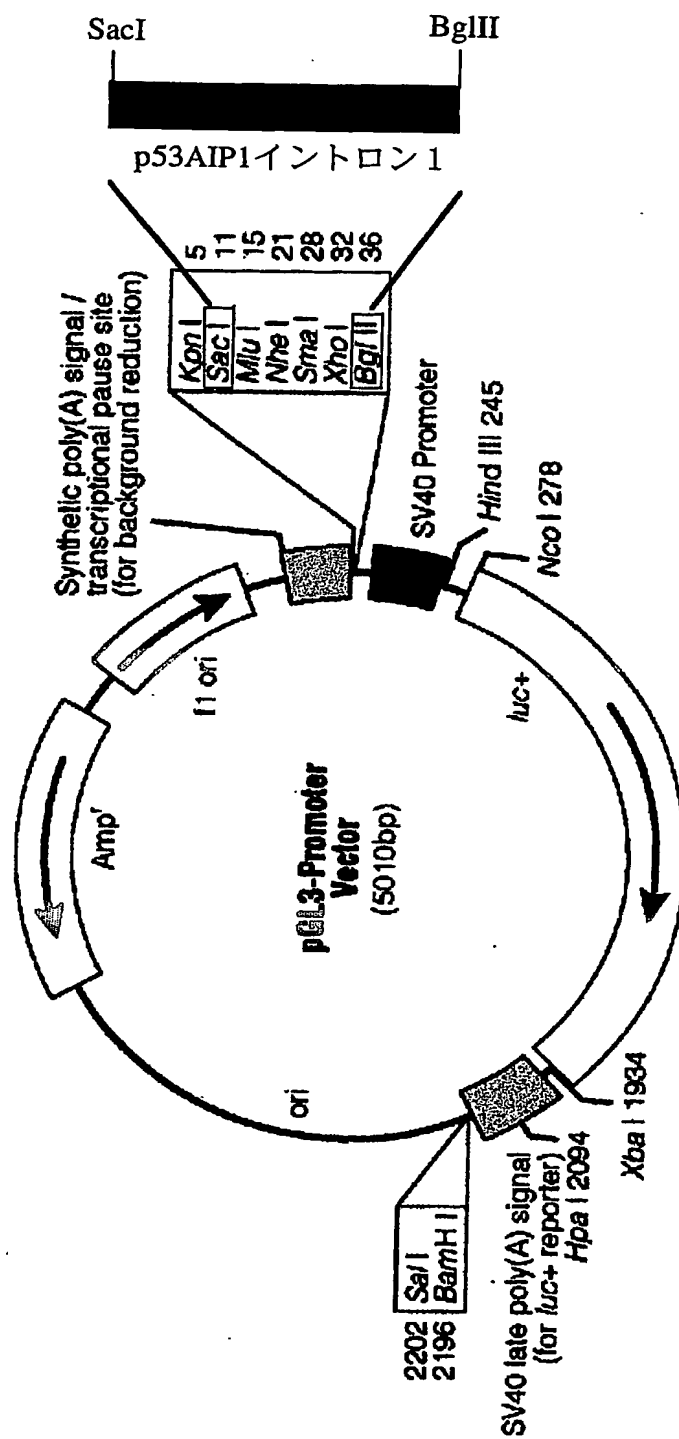
2/7

第 2 図



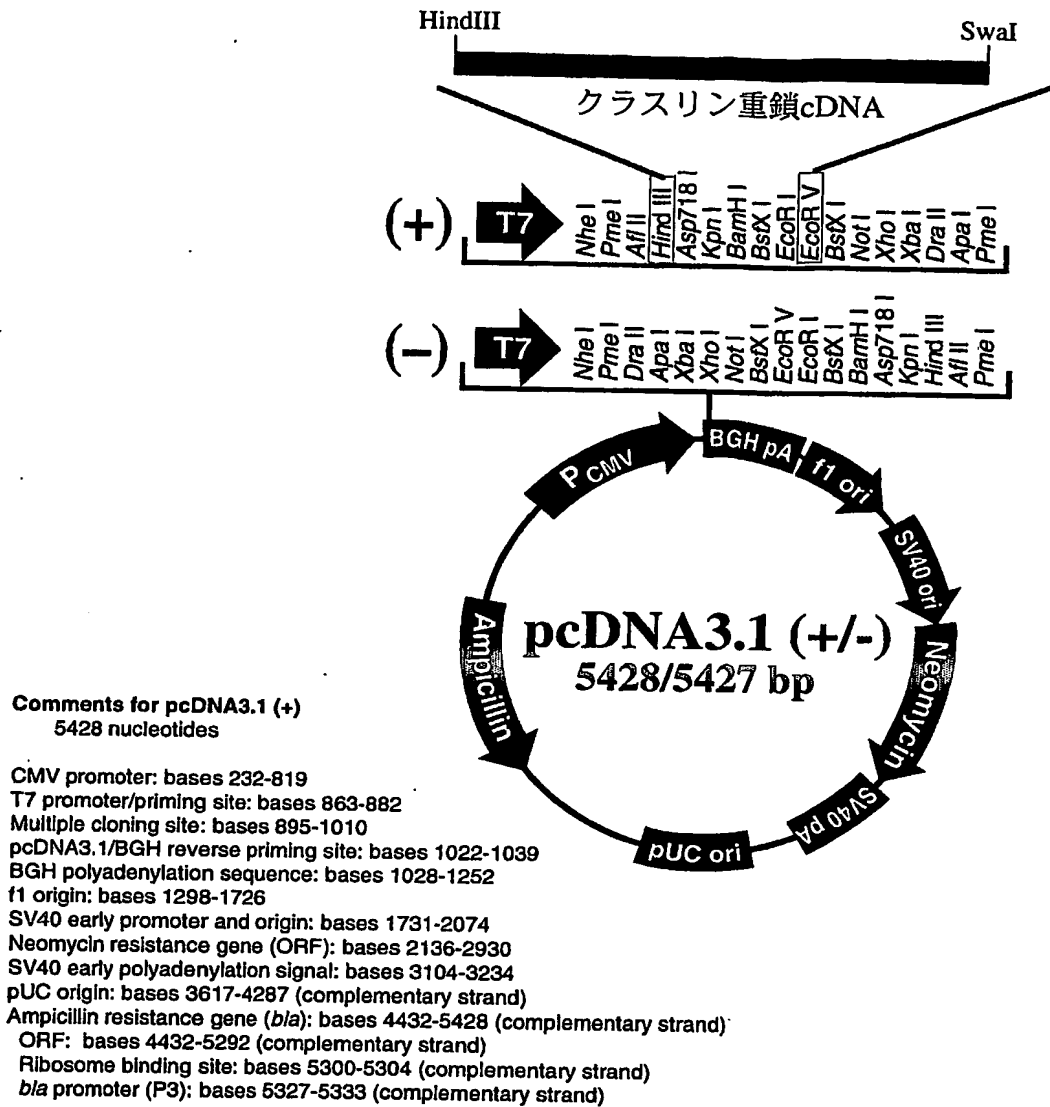
3/7

第 3 図



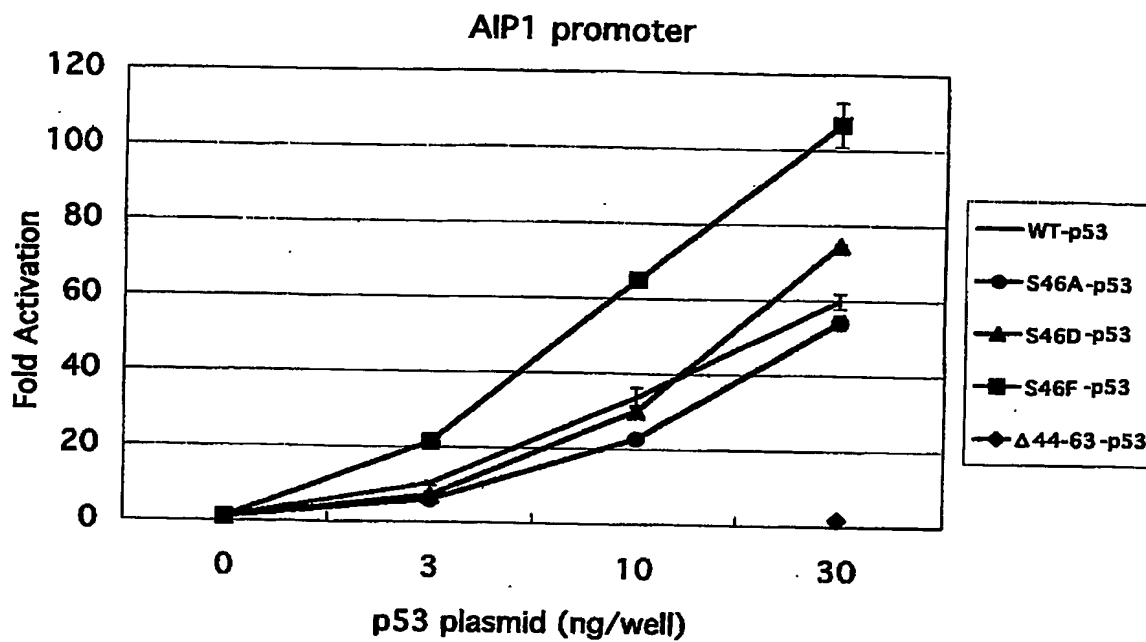
4/7

第 4 図



5/7

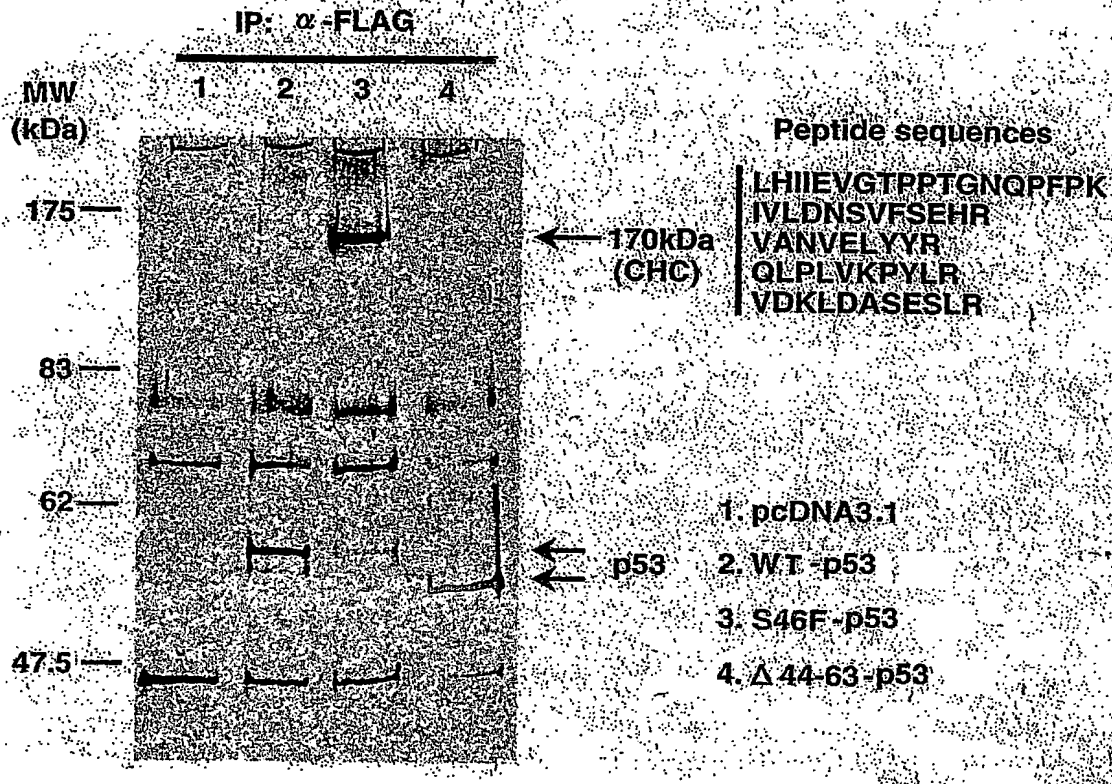
第 5 図



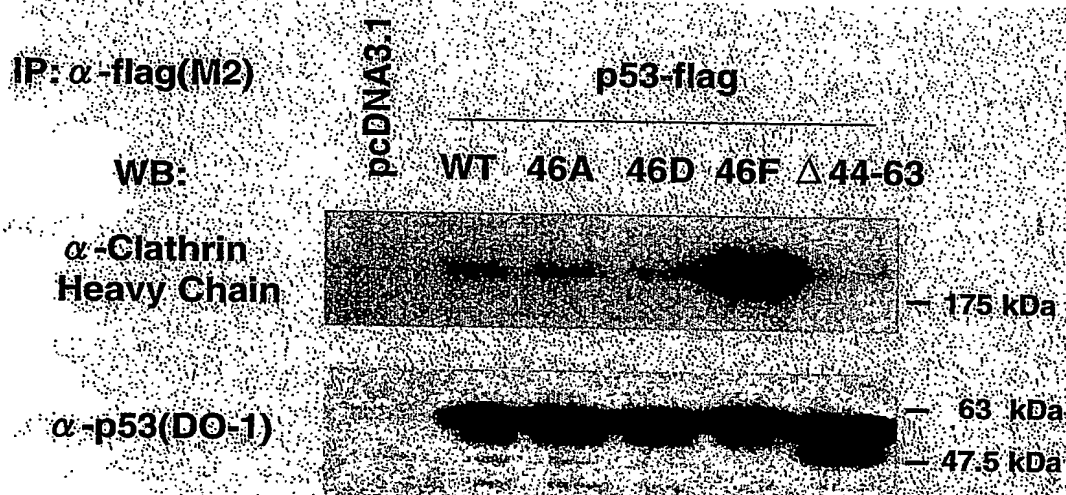
6/7

第 6 図

(a) Silver staining



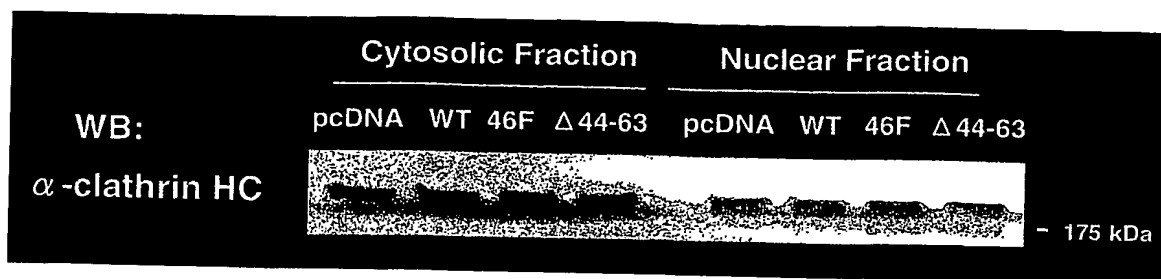
第 7 図



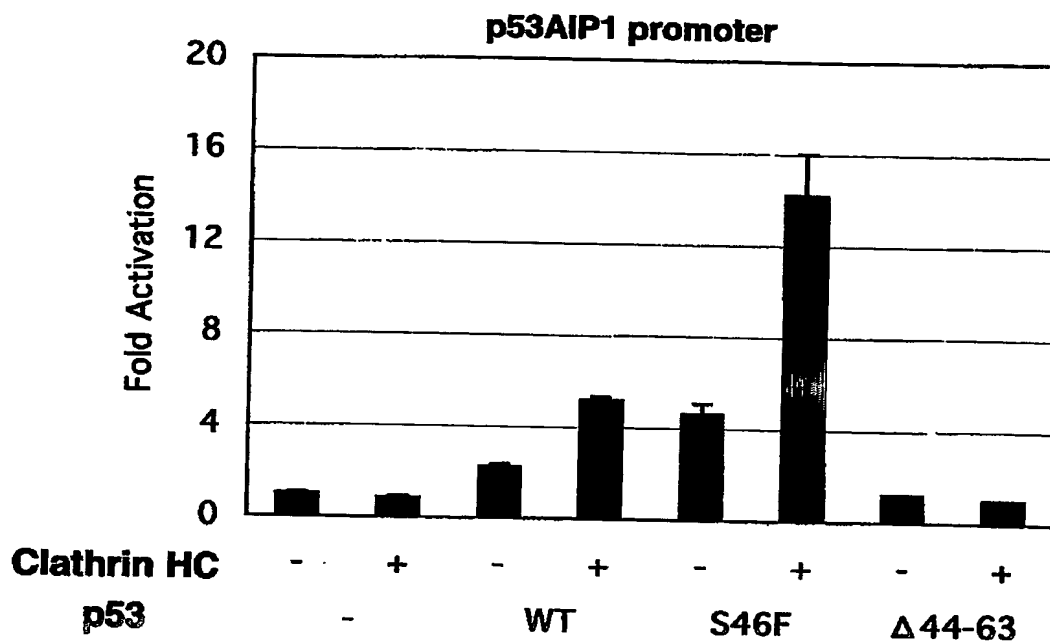
BEST AVAILABLE COPY

7/7

第 8 図



第 9 図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> 癌細胞のアポトーシスを誘導する転写因子

<130> FS04-408PCT

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro

65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser

85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly

100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro

115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln

130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160
Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175
Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190
His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205
Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220
Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240
Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255
Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270
His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285
Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300
Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320
Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335
Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350
Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365
Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met

370 375 380
Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390
<210> 2
<211> 1675
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Ala Gln Ile Leu Pro Ile Arg Phe Gln Glu His Leu Gln Leu Gln
1 5 10 15
Asn Leu Gly Ile Asn Pro Ala Asn Ile Gly Phe Ser Thr Leu Thr Met
20 25 30
Glu Ser Asp Lys Phe Ile Cys Ile Arg Glu Lys Val Gly Glu Gln Ala
35 40 45
Gln Val Val Ile Ile Asp Met Asn Asp Pro Ser Asn Pro Ile Arg Arg
50 55 60
Pro Ile Ser Ala Asp Ser Ala Ile Met Asn Pro Ala Ser Lys Val Ile
65 70 75 80
Ala Leu Lys Ala Gly Lys Thr Leu Gln Ile Phe Asn Ile Glu Met Lys
85 90 95
Ser Lys Met Lys Ala His Thr Met Thr Asp Asp Val Thr Phe Trp Lys
100 105 110
Trp Ile Ser Leu Asn Thr Val Ala Leu Val Thr Asp Asn Ala Val Tyr
115 120 125
His Trp Ser Met Glu Gly Glu Ser Gln Pro Val Lys Met Phe Asp Arg
130 135 140
His Ser Ser Leu Ala Gly Cys Gln Ile Ile Asn Tyr Arg Thr Asp Ala
145 150 155 160
Lys Gln Lys Trp Leu Leu Leu Thr Gly Ile Ser Ala Gln Gln Asn Arg

165 170 175
Val Val Gly Ala Met Gln Leu Tyr Ser Val Asp Arg Lys Val Ser Gln
180 185 190
Pro Ile Glu Gly His Ala Ala Ser Phe Ala Gln Phe Lys Met Glu Gly
195 200 205
Asn Ala Glu Glu Ser Thr Leu Phe Cys Phe Ala Val Arg Gly Gln Ala
210 215 220
Gly Gly Lys Leu His Ile Ile Glu Val Gly Thr Pro Pro Thr Gly Asn
225 230 235 240
Gln Pro Phe Pro Lys Lys Ala Val Asp Val Phe Phe Pro Pro Glu Ala
245 250 255
Gln Asn Asp Phe Pro Val Ala Met Gln Ile Ser Glu Lys His Asp Val
260 265 270
Val Phe Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Tyr Ile His Leu Tyr Asp Leu Glu
275 280 285
Thr Gly Thr Cys Ile Tyr Met Asn Arg Ile Ser Gly Glu Thr Ile Phe
290 295 300
Val Thr Ala Pro His Glu Ala Thr Ala Gly Ile Ile Gly Val Asn Arg
305 310 315 320
Lys Gly Gln Val Leu Ser Val Cys Val Glu Glu Glu Asn Ile Ile Pro
325 330 335
Tyr Ile Thr Asn Val Leu Gln Asn Pro Asp Leu Ala Leu Arg Met Ala
340 345 350
Val Arg Asn Asn Leu Ala Gly Ala Glu Glu Leu Phe Ala Arg Lys Phe
355 360 365
Asn Ala Leu Phe Ala Gln Gly Asn Tyr Ser Glu Ala Ala Lys Val Ala
370 375 380
Ala Asn Ala Pro Lys Gly Ile Leu Arg Thr Pro Asp Thr Ile Arg Arg
385 390 395 400

Phe Gln Ser Val Pro Ala Gln Pro Gly Gln Thr Ser Pro Leu Leu Gln
405 410 415

Tyr Phe Gly Ile Leu Leu Asp Gln Gly Gln Leu Asn Lys Tyr Glu Ser
420 425 430

Leu Glu Leu Cys Arg Pro Val Leu Gln Gln Gly Arg Lys Gln Leu Leu
435 440 445

Glu Lys Trp Leu Lys Glu Asp Lys Leu Glu Cys Ser Glu Glu Leu Gly
450 455 460

Asp Leu Val Lys Ser Val Asp Pro Thr Leu Ala Leu Ser Val Tyr Leu
465 470 475 480

Arg Ala Asn Val Pro Asn Lys Val Ile Gln Cys Phe Ala Glu Thr Gly
485 490 495

Gln Val Gln Lys Ile Val Leu Tyr Ala Lys Lys Val Gly Tyr Thr Pro
500 505 510

Asp Trp Ile Phe Leu Leu Arg Asn Val Met Arg Ile Ser Pro Asp Gln
515 520 525

Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Leu Val Gln Asp Glu Glu Pro Leu Ala
530 535 540

Asp Ile Thr Gln Ile Val Asp Val Phe Met Glu Tyr Asn Leu Ile Gln
545 550 555 560

Gln Cys Thr Ala Phe Leu Leu Asp Ala Leu Lys Asn Asn Arg Pro Ser
565 570 575

Glu Gly Pro Leu Gln Thr Arg Leu Leu Glu Met Asn Leu Met His Ala
580 585 590

Pro Gln Val Ala Asp Ala Ile Leu Gly Asn Gln Met Phe Thr His Tyr
595 600 605

Asp Arg Ala His Ile Ala Gln Leu Cys Glu Lys Ala Gly Leu Leu Gln
610 615 620

Arg Ala Leu Glu His Phe Thr Asp Leu Tyr Asp Ile Lys Arg Ala Val

625 630 635 640
Val His Thr His Leu Leu Asn Pro Glu Trp Leu Val Asn Tyr Phe Gly
 645 650 655
Ser Leu Ser Val Glu Asp Ser Leu Glu Cys Leu Arg Ala Met Leu Ser
 660 665 670
Ala Asn Ile Arg Gln Asn Leu Gln Ile Cys Val Gln Val Ala Ser Lys
 675 680 685
Tyr His Glu Gln Leu Ser Thr Gln Ser Leu Ile Glu Leu Phe Glu Ser
 690 695 700
Phe Lys Ser Phe Glu Gly Leu Phe Tyr Phe Leu Gly Ser Ile Val Asn
705 710 715 720
Phe Ser Gln Asp Pro Asp Val His Phe Lys Tyr Ile Gln Ala Ala Cys
 725 730 735
Lys Thr Gly Gln Ile Lys Glu Val Glu Arg Ile Cys Arg Glu Ser Asn
 740 745 750
Cys Tyr Asp Pro Glu Arg Val Lys Asn Phe Leu Lys Glu Ala Lys Leu
 755 760 765
Thr Asp Gln Leu Pro Leu Ile Ile Val Cys Asp Arg Phe Asp Phe Val
 770 775 780
His Asp Leu Val Leu Tyr Leu Tyr Arg Asn Asn Leu Gln Lys Tyr Ile
785 790 795 800
Glu Ile Tyr Val Gln Lys Val Asn Pro Ser Arg Leu Pro Val Val Ile
 805 810 815
Gly Gly Leu Leu Asp Val Asp Cys Ser Glu Asp Val Ile Lys Asn Leu
 820 825 830
Ile Leu Val Val Arg Gly Gln Phe Ser Thr Asp Glu Leu Val Ala Glu
 835 840 845
Val Glu Lys Arg Asn Arg Leu Lys Leu Leu Leu Pro Trp Leu Glu Ala
 850 855 860

Arg Ile His Glu Gly Cys Glu Glu Pro Ala Thr His Asn Ala Leu Ala
865 870 875 880

Lys Ile Tyr Ile Asp Ser Asn Asn Asn Pro Glu Arg Phe Leu Arg Glu
885 890 895

Asn Pro Tyr Tyr Asp Ser Arg Val Val Gly Lys Tyr Cys Glu Lys Arg
900 905 910

Asp Pro His Leu Ala Cys Val Ala Tyr Glu Arg Gly Gln Cys Asp Leu
915 920 925

Glu Leu Ile Asn Val Cys Asn Glu Asn Ser Leu Phe Lys Ser Leu Ser
930 935 940

Arg Tyr Leu Val Arg Arg Lys Asp Pro Glu Leu Trp Gly Ser Val Leu
945 950 955 960

Leu Glu Ser Asn Pro Tyr Arg Arg Pro Leu Ile Asp Gln Val Val Gln
965 970 975

Thr Ala Leu Ser Glu Thr Gln Asp Pro Glu Glu Val Ser Val Thr Val
980 985 990

Lys Ala Phe Met Thr Ala Asp Leu Pro Asn Glu Leu Ile Glu Leu Leu
995 1000 1005

Glu Lys Ile Val Leu Asp Asn Ser Val Phe Ser Glu His Arg Asn
1010 1015 1020

Leu Gln Asn Leu Leu Ile Leu Thr Ala Ile Lys Ala Asp Arg Thr
1025 1030 1035

Arg Val Met Glu Tyr Ile Asn Arg Leu Asp Asn Tyr Asp Ala Pro
1040 1045 1050

Asp Ile Ala Asn Ile Ala Ile Ser Asn Glu Leu Phe Glu Glu Ala
1055 1060 1065

Phe Ala Ile Phe Arg Lys Phe Asp Val Asn Thr Ser Ala Val Gln
1070 1075 1080

Val Leu Ile Glu His Ile Gly Asn Leu Asp Arg Ala Tyr Glu Phe

1085	1090	1095
Ala Glu Arg Cys Asn Glu Pro	Ala Val Trp Ser Gln	Leu Ala Lys
1100	1105	1110
Ala Gln Leu Gln Lys Gly Met	Val Lys Glu Ala Ile	Asp Ser Tyr
1115	1120	1125
Ile Lys Ala Asp Asp Pro Ser	Ser Tyr Met Glu Val	Val Gln Ala
1130	1135	1140
Ala Asn Thr Ser Gly Asn Trp	Glu Glu Leu Val Lys	Tyr Leu Gln
1145	1150	1155
Met Ala Arg Lys Lys Ala Arg	Glu Ser Tyr Val Glu	Thr Glu Leu
1160	1165	1170
Ile Phe Ala Leu Ala Lys Thr	Asn Arg Leu Ala Glu	Leu Glu Glu
1175	1180	1185
Phe Ile Asn Gly Pro Asn Asn	Ala His Ile Gln Gln	Val Gly Asp
1190	1195	1200
Arg Cys Tyr Asp Glu Lys Met	Tyr Asp Ala Ala Lys	Leu Leu Tyr
1205	1210	1215
Asn Asn Val Ser Asn Phe Gly	Arg Leu Ala Ser Thr	Leu Val His
1220	1225	1230
Leu Gly Glu Tyr Gln Ala Ala	Val Asp Gly Ala Arg	Lys Ala Asn
1235	1240	1245
Ser Thr Arg Thr Trp Lys Glu	Val Cys Phe Ala Cys	Val Asp Gly
1250	1255	1260
Lys Glu Phe Arg Leu Ala Gln	Met Cys Gly Leu His	Ile Val Val
1265	1270	1275
His Ala Asp Glu Leu Glu Glu	Leu Ile Asn Tyr Tyr	Gln Asp Arg
1280	1285	1290
Gly Tyr Phe Glu Glu Leu Ile	Thr Met Leu Glu Ala	Ala Leu Gly
1295	1300	1305

Leu Glu	Arg Ala His Met Gly	Met Phe Thr Glu Leu	Ala Ile Leu
1310	1315	1320	
Tyr Ser	Lys Phe Lys Pro Gln	Lys Met Arg Glu His	Leu Glu Leu
1325	1330	1335	
Phe Trp	Ser Arg Val Asn Ile	Pro Lys Val Leu Arg	Ala Ala Glu
1340	1345	1350	
Gln Ala	His Leu Trp Ala Glu	Leu Val Phe Leu Tyr	Asp Lys Tyr
1355	1360	1365	
Glu Glu	Tyr Asp Asn Ala Ile	Ile Thr Met Met Asn	His Pro Thr
1370	1375	1380	
Asp Ala	Trp Lys Glu Gly Gln	Phe Lys Asp Ile Ile	Thr Lys Val
1385	1390	1395	
Ala Asn	Val Glu Leu Tyr Tyr	Arg Ala Ile Gln Phe	Tyr Leu Glu
1400	1405	1410	
Phe Lys	Pro Leu Leu Leu Asn	Asp Leu Leu Met Val	Leu Ser Pro
1415	1420	1425	
Arg Leu	Asp His Thr Arg Ala	Val Asn Tyr Phe Ser	Lys Val Lys
1430	1435	1440	
Gln Leu	Pro Leu Val Lys Pro	Tyr Leu Arg Ser Val	Gln Asn His
1445	1450	1455	
Asn Asn	Lys Ser Val Asn Glu	Ser Leu Asn Asn Leu	Phe Ile Thr
1460	1465	1470	
Glu Glu	Asp Tyr Gln Ala Leu	Arg Thr Ser Ile Asp	Ala Tyr Asp
1475	1480	1485	
Asn Phe	Asp Asn Ile Ser Leu	Ala Gln Arg Leu Glu	Lys His Glu
1490	1495	1500	
Leu Ile	Glu Phe Arg Arg Ile	Ala Ala Tyr Leu Phe	Lys Gly Asn
1505	1510	1515	
Asn Arg	Trp Lys Gln Ser Val	Glu Leu Cys Lys Lys	Asp Ser Leu

10/16

1520	1525	1530
Tyr Lys Asp Ala Met Gln Tyr	Ala Ser Glu Ser Lys	Asp Thr Glu
1535	1540	1545
Leu Ala Glu Glu Leu Leu Gln	Trp Phe Leu Gln Glu	Glu Lys Arg
1550	1555	1560
Glu Cys Phe Gly Ala Cys Leu	Phe Thr Cys Tyr Asp	Leu Leu Arg
1565	1570	1575
Pro Asp Val Val Leu Glu Thr	Ala Trp Arg His Asn	Ile Met Asp
1580	1585	1590
Phe Ala Met Pro Tyr Phe Ile	Gln Val Met Lys Glu	Tyr Leu Thr
1595	1600	1605
Lys Val Asp Lys Leu Asp Ala	Ser Glu Ser Leu Arg	Lys Glu Glu
1610	1615	1620
Glu Gln Ala Thr Glu Thr Gln	Pro Ile Val Tyr Gly	Gln Pro Gln
1625	1630	1635
Leu Met Leu Thr Ala Gly Pro	Ser Val Ala Val Pro	Pro Gln Ala
1640	1645	1650
Pro Phe Gly Tyr Gly Tyr Thr	Ala Pro Pro Tyr Gly	Gln Pro Gln
1655	1660	1665
Pro Gly Phe Gly Tyr Ser Met		
1670	1675	

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu His Ile Ile Glu Val Gly Thr Pro Pro Thr Gly Asn Gln Pro Phe

1

5

10

15

Pro Lys

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Val Leu Asp Asn Ser Val Phe Ser Glu His Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Ala Asn Val Glu Leu Tyr Tyr Arg

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Leu Pro Leu Val Lys Pro Tyr Leu Arg

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Asp Lys Leu Asp Ala Ser Glu Ser Leu Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> flag

<400> 8

Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 9

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca	60
gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg	120
gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tactgaaga ccaggtcca	180
gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgctgg ccctgcacc agcagctcct	240
acaccggcgg ccctgcacc agccccctcc tggccccctgt catcttctgt cccttcccag	300
aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag	360
tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt ttgccaact ggccaagacc	420
tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca ccccgcccg gcaccgcgt ccgcgcatg	480
gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgtgccc ccaccatgag	540
cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcacc ttatccgagt ggaaggaaat	600
ttgcgtgtgg agtatttggga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat	660
gagccgcctg aggttggtc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt	720
tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc	780
agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcatg tttgtgcctg tcctgggaga	840
gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc	900

ccaggaggaca ctaagcgagc actgccaac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 960
 aaaccactgg atggagaata tttcacctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1020
 ttccgagagc tgaatgagcg cttggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg 1080
 gggagcaggg ctactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgcct 1140
 aaaaaactca tgttcaagac agaaggcct gactcagact ga 1182

<210> 10

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccatttcctc agagaacacg gcccccttgg gccaaaagga catgaagaag ctcttgctaa 60
 tgccagcctg gctctcctca tcccgcccc tgcaccctg cccttctggc tgccctccct 120
 tctcctagct ctgtcccctc tcacttcagg agtctcaagt ccttcagact actccaaagt 180
 cgggggatct ctggatgggt aggaggtgat ctaccgcct cctctcttgc ccgggcttgt 240
 cgagatgaac ttctgatgc tggcggcgct gaagctgaca ctagcggggg cacctccctg 300
 acatgaacgc cctcgagac tgggccagtg ctctgatgc ctgggcacct gcggaaggc 360
 acccagcgtg gccgccgtgg catgccttga gtgtgtgggt ggggactgtt gcaaactgac 420
 attccagctg tcccagtcca ttttgtgctg ctctcacaca acccc 465

<210> 11

<211> 5028

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggcccaga ttctgccaat tcgttttcag gagcatctcc agctccagaa cctgggtatc 60
 aaccagcaa acattggctt cagtaccctg actatggagt ctgacaaatt catctgcatt 120
 agagaaaaag taggagagca ggcccaggtg gtaatcattg atatgaatga cccaagtaat 180
 ccaattcgaa gaccaatttc agcagacagc gccatcatga atccagctag caaagtaatt 240
 gcactgaaag ctgggaaaac tcttcagatt ttaacattg aaatgaaaag taaaatgaag 300
 gctcatacca tgactgatga tgtcacctt tggaaatgga tctctttgaa tacggttgct 360

cttgttacgg ataatgcagt ttatcactgg agtatggaag gagagtctca gccagtgaaa 420
 atgtttgatc gccattctag ccttgcaggg tgccagatta tcaattaccg tacagatgca 480
 aaacaaaagt ggttacttct gactgggtata tctgcacagc aaaatcgtgt ggtgggagct 540
 atgcagctat attctgtaga taggaaagtg tctcagccca ttgaaggaca tgcagctagc 600
 ttgcacagt ttaagatgga aggaaatgca gaagaatcaa cgttatittg ttttgcagtt 660
 cggggccaag ctggagggaa gttacatatt attgaagttg gcacaccacc tacagggaac 720
 cagcccttcc caaagaaggc agtggatgtc ttctttcctc cagaagcaca aaatgatttt 780
 cctgttgcaa tgcagatcag tgaagagcat gatgtggtgt tcttgataac caagtatggt 840
 tataaccacc tctatgatct tgagactggt acctgcatct acatgaatag aatcagtgga 900
 gaaacaattt ttgttactgc acctcatgaa gccacagctg gaataattgg agtaaacaga 960
 aagggacaag ttctgtcagt gtgtgtggaa gaagaaaaca taattcctta catcaccaat 1020
 gttctacaaa atcctgattt ggctctgaga atggctgtac gtaataactt agccggtgct 1080
 gaagaactct ttgcccgaa atttaatgct ctttttgccc agggaaatta ctccggaggca 1140
 gcaaagggtg ctgctaatac accaaaggga attcttcgta ctccagacac tatccgtcgg 1200
 ttccagagtg tcccagccca gccaggtcaa acttctcctc tacttcagta ctttgggtatc 1260
 cttttggacc agggacagct caacaaatac gaatccttag agctttgtag gcctgtactt 1320
 cagcaagggc gaaaacagct tttggagaaa tggttaaaag aagataagct ggaatgttct 1380
 gaagaactgg gtgatcttgt gaaatctgtg gaccctacat tggcacttag tgtgtaccta 1440
 agggctaacg tcccaaataa agtcattcag tgctttgcag aaacaggtca agtccaaaag 1500
 attgttttat atgctaaaaa agttggatac actccagatt ggatatttct gctgagaaat 1560
 gtaatgcgaa tcagtccaga tcaggacag cagtttgccc aaatgttagt tcaagatgaa 1620
 gagcctcttg ctgacatcac acagattgta gatgtcttta tggaatacaa tctaattcag 1680
 cagtgtactg cattcttget tgatgctctg aagaataatc gcccatctga aggtccttta 1740
 cagacgcggt tacttgagat gaaccttatg catgcgcctc aagttgcaga tgctattcta 1800
 ggcaatcaga tgttcacaca ttatgaccgg gctcatattg ctcaactgtg tgaaaaggct 1860
 ggccactgac agcgtgcatt agaacatttc actgatttat atgatataaa acgtgcagtg 1920
 gttcacaccc atcttcttaa ccctgagtgg ttagtcaact actttggttc cttatcagta 1980
 gaagactccc tagaatgtct cagagccatg ctgtctgccca acatccgtca gaatctgcag 2040
 atttgtgttc aggtggcttc taaatatcat gaacaactgt caactcagtc tctgattgaa 2100

ctttttgaat ctttcaagag ttttgaaggt ctcttttatt ttctgggatc cattgttaac 2160
tttagccagg acccagatgt gcactttaaa tatattcagg cagcttgcaa gactgggcaa 2220
atcaaagaag tagaaagaat ctgtagagaa agcaactgct acgatcctga gcgagtcaag 2280
aattttctta aggaagcaaa actaacagat cagctaccac ttatcattgt gtgtgatcga 2340
tttgactttg tccatgattt ggtgctctat ttatatagaa ataactttca aaagtatata 2400
gagatatatg tacagaaggt gaatccaagt cgacttcctg tagttattgg aggattactt 2460
gatgttgact gttctgaaga tgtcataaaa aacttgattc ttgttgtaag aggtcaattc 2520
tctactgatg agcttgttgc tgagggtgaa aaaagaaaca gattgaaact gcttctgcct 2580
tggctagagg ccagaattca tgagggtgtg gaggagcctg ctactcacia tgccttagcc 2640
aaaatctaca tagacagtaa taacaaccgg gagagatttc ttctgaaaa tccctactat 2700
gacagtcgcg ttgttgaaa gtattgtgag aagagagatc cacatctggc ctgtgttgct 2760
tatgaacgtg gccaatgtga tctggaactt attaatgttt gcaatgagaa ttccctcttc 2820
aaaagtcttt ctgctacct ggtacgtcga aaggatccag aattgtgggg cagcgtgctg 2880
ctggaaagca atccttacag gagacccta attgaccagg ttgtacaaac agctttgtct 2940
gagactcagg accctgaaga agtgtcagta actgtaaagg ctttcatgac tgcagacctt 3000
cctaataaac tcattgaact gctggagaaa attgtccttg ataactctgt attcagtga 3060
cacaggaatc tgcaaaacct ccttatcctc actgcaatta aggctgaccg tacacgtgtt 3120
atggagtata ttaaccgcct ggataattat gatgccccag atattgcaa tatcgccatc 3180
agcaatgagc tgtttgaaga agcatttgcc attttccgga aatttgatgt caatacttca 3240
gcagttcagg tcttaattga gcatattgga aacttgatc gggcatatga gtttgctgaa 3300
cgttgcaatg aacctgcggt ctggagtcaa cttgcaaaag ccagttgca gaaaggaatg 3360
gtgaaagaag ccattgattc ttatatcaaa gcagatgatc cttcctccta catggaagtt 3420
gttcaggctg ccaatactag tggaaactgg gaagaactgg tgaagtactt gcagatggcc 3480
cgtaagaagg ctgagagtc ctatgtggag acagaactga tattcgact ggctaaaaa 3540
aaccgccttg cagagttaga agaatttatc aatggaccaa ataatgtca tatccaacaa 3600
gttggtgacc gttgttatga tgaaaaaatg tatgatgctg ctaagttgtt gtacaataat 3660
gtttccaatt ttggacgttt ggcactacc ctggttcacc tgggtgaata tcaggcagct 3720
gttgatgggg ctaggaaagc taacagtact cgaacatgga aagaggtctg cttcgctgt 3780
gtagatggga aagaattccg tcttgtcag atgtgtggac ttcatattgt tgtacatgca 3840

gatgaattag aagaacttat caactactat caggatcgtg gctatittga agagctgac 3900
accatgttgg aagcagcact gggacttgag cgagctcaca tgggaatgtt tactgaatta 3960
gctattctat actctaaatt taagcctcag aaaatgaggg agcacctgga gctgttctgg 4020
tctagagtga atattcccaa ggtgctaaga gctgcagaac aagctcatct ttgggcagaa 4080
ctgggtgttt tgtatgacaa gtatgaagaa tatgataatg ccataattac catgatgaat 4140
catccaactg atgcctggaa agaagggcaa ttcaaagata tcattaccaa ggttgccaat 4200
gtggaactat actacagagc aatacagttc tacttagaat tcaagcctct gttgttaaat 4260
gatttgctga tgggtgctgc tccacggtg gatcacactc gtgcagtcaa ttatttcagc 4320
aaggttaaac agctaccact ggtgaaaccg tatttgcgtt cagttcagaa ccataacaac 4380
aaatctgtga atgaatcatt gaacaatctt tttattacag aagaagatta tcaggctctg 4440
cgaacatcaa tagatgetta tgacaacttt gacaatatct cgcttgctca gcgtttggaa 4500
aaacatgaac tcattgagtt caggagaatt gctgcttate tcttcaaagg caacaatcgc 4560
tggaacaga gtgtagagct gtgcaagaaa gacagccttt acaaggatgc aatgcagtat 4620
gcttctgaat ctaaagatac tgaattggct gaagaactcc tgcagtgggt tttgcaggaa 4680
gaaaaaagag agtgctttgg agcttgctctg tttacctgtt acgatctttt aaggccagat 4740
gtcgtcctag aaactgcatg gaggcacaat atcatggatt ttgccatgcc ctatttcac 4800
caggtcatga aggagtactt gacaaagggt gataaattag atgcttcaga atcactgaga 4860
aaagaagaag aacaagctac agagacacaa cccattgttt atggtcagcc ccagttgatg 4920
ctgacagcag gacccagtgt tgccgtccct cccaggcac cttttggtta tggttatacc 4980
gcaccaccgt atggacagcc acagcctggc tttgggtaca gcatgtga 5028

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hirofumi ARAKAWA et al., "Tensha Inshi p53 ni yotte Seigyo sareru Idenshigun", Cell Technology, 22 December, 2002 (22.12.02), Vol.22, No.1, 2003, pages 23 to 28	1-4
X A	Yoichi TAYA, "p53 no Rinsanka to Acetyl-ka ni yoru Saibo Kino no Seigyo", Cell Technology, 22 December, 2002 (22.12.02), Vol.22, No.1, 2003, pages 29 to 33	1, 4 2, 3
A	WO 00/31238 A2 (GENETICA, INC.), 02 June, 2000 (02.06.00), & JP 2002-530436 A & EP 1133552 A	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 March, 2004 (16.03.04)

Date of mailing of the international search report
30 March, 2004 (30.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002238

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 5

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 5 relates to a method of treating cancer which pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy. Thus it relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002238

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

of the PCT and Rule 39.1 (iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, A61K38/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN) BIOSIS (STN) WPIDS (STN) JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	荒川博文 他, 転写因子 p 53 によって制御される遺伝子群, 細胞工学, 2002. 12. 22, Vol. 22, No. 1, 2003, p. 23-28	1-4
<u>X</u> A	田矢洋一, p 53 のリン酸化とアセチル化による細胞機能の制御, 細胞工学, 2002. 12. 22, Vol. 22, No. 1, 2003, p. 29-33	<u>1, 4</u> 2, 3
A	WO 00/31238 A2 (GENETICA, INC.) 2000. 06. 02 & JP 2002-530436 A & EP 1133552 A	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 03. 2004

国際調査報告の発送日

30. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中晴絵

4N

9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲5は、癌治療法に関するものであって、人の身体の手術または治療による処置及び診断方法に該当し、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。